

表 3. 再発症例(全て三日熱マラリア)

年齢	性別	国籍	感染国	再発前のプリマキン用法・用量	体重当たり総投与量(mg/kg)	再発までの期間(月)
46	男	日本	インドネシア	15mg/日・14日間	2.96	8
63	女	日本	PNG	15mg/日・10日間	2.41	2
63	女	日本	PNG	15mg/日・14日間	3.62	1
53	男	日本	ミャンマー	15mg/日・14日間	ND	2
48	男	日本	PNG	15mg/日・14日間	2.56	4
39	男	ブラジル	ブラジル	? mg/日・14日間	ND	2
23	女	米国	タイ	15mg/日・14日間	3.09	3

PNG、パプアニューギニア；ND、算定不可能
63歳女性は同一症例で、2度の再発あり

あった。再発例を国別で見ると、パプアニューギニアが3例で(感染者数19例で再発率15.8%)、他は1例ずつであった。そこで、プリマキン15mg/日・14日間投与例に限り、再発例と非再発例とで体重当たり総量をプロットしたのが図1である。非再発例と比較して再発例での体重当たり総投与量は有意に低かった。そして、プリマキン総投与量が3.62mg/kgを超える場合には再発は見られなかった。

D. 考察

三日熱マラリアにおける再発予防目的でのプリマキンについては、主に1950年代に、朝鮮戦争から帰還したアフリカ系アメリカ黒人で重篤な溶血を生じる懸念がないことを元に、標準療法が行われてきた。しかしその頃でも既に、パプアニューギニアのChesson株では再発を防げないことが分っていた。そして、特に1980年代

以降にパプアニューギニア、東南アジア、インド、コロンビアなどにおける標準療法の失敗例が報告され、それらは中央アメリカ、南アメリカなどの地域でも知られるようになり、プリマキンの1日量を22.5mg、さらには30mgに増量すると再発率低下を来することが示された。タイでの研究からは(おそらく1990年代前半)、15mg/日・14日間と22.5mg/日・14日間の投与を比べ、再発率が前者で17.5%、後者で2.4%であり、1999年9月～2001年9月の期間のオーストラリア陸軍軍人における再発率は、22.5mg/日・14日間で47%(35/75)、30mg/日・14日間で7%(5/71)と大きな差が見られている。このようなことから、最近の先進国のガイドラインでも30mg/日・14日間の投与が勧められるようになった。

プリマキン標準療法で再発予防が失敗する場合、1)真の薬剤耐性、2)免疫の低下、3)消化管

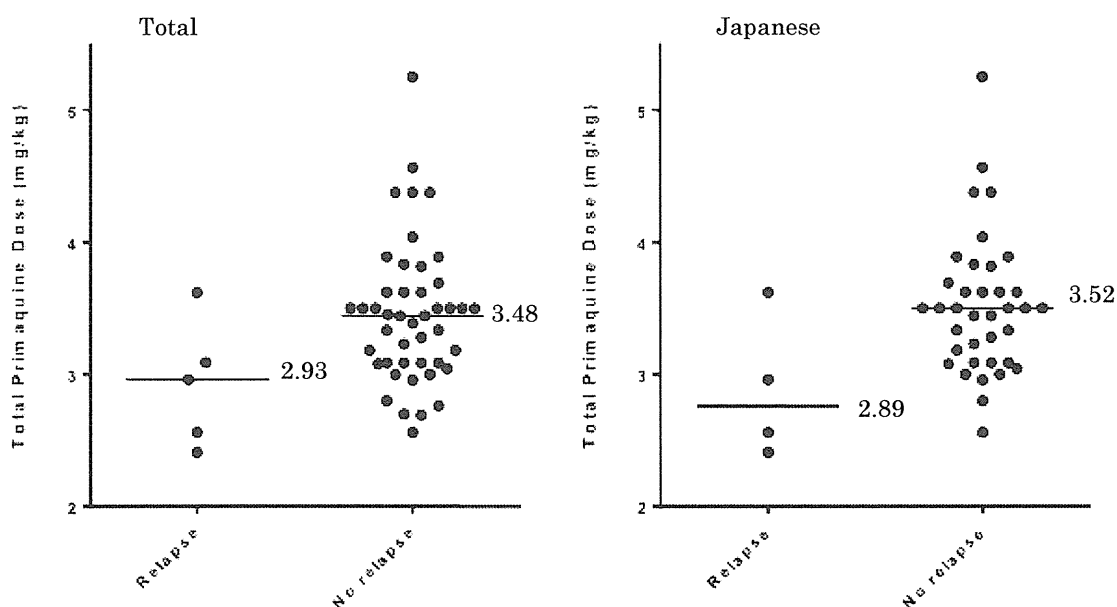


図1. プリマキン標準療法後の再発の有無と体重当たり総量との関係

からの不十分な薬剤の吸収、4) 服薬コンプライアンスの低下、5) 薬剤の品質低下、6) 体重当たりの用量の低下、などが考えられる。このうち、1) については三日熱マラリア原虫特にその休眠原虫の試験管内培養が不可能であり、確定することはできない。3) 4) については実例での観察により、主要な因子とは考えられていない。5) については、世界各地でプリマキン失敗例が見られていることから考えにくい。

1995年1月～1998年6月に、エチオピアから帰国したイスラエル人旅行者の三日熱マラリア症例で検討がなされた。プリマキン標準療法における成功例と失敗例につき、体重当たり総量を比べると、前者では 4.0 ± 0.5 mg/kgで、後者で 2.4 ± 0.4 mg/kg(範囲 2.1～3.2)であり、3.5 mg/kg以上では12例中全員に再発が見られなかった。さらに1997年2月～1998年10月に、ブラジルで感染した三日熱マラリア患者でプリマキン標準療法を受けた症例の解析が行われたが、体重当たり総量が非再発例では 3.35 ± 0.67 mg/kg、再発例では 2.76 ± 0.52 mg/kgであり、4.2 mg/kg以上では5名中全員が再発しなかった。今回の我々のデータでも、プリマキン標準療法による非再発例と再発例との検討では、体重当たりの総投与量が後者では有意に低く、総量 3.62 mg/kgを超える症例では再発がみられなかった。本研究が上記2件と異なる点は、様々な地域における感染例での解析であったことである。最近、30 mg/kg・14日間の高用量が推奨されることが多くなっているが、体重が少ない人では高用量が必要ないことを意味する。このことは、不必要な高用量投与による副作用の危険を避けられる点で重要であろう。

なお、卵形マラリアではプリマキン投与後の再発は殆どなく、再発例では服薬遵守が確認されていないとの疑問が出されていた。しかし、ベルギーでの輸入卵形マラリア3例でプリマキン投与後の再発例が報告された。1例目はガーナでの感染例で、プリマキン標準療法後に再発がみられ、22.5 mg/日・14日間投与(総量 7 mg/kg)で治癒に至った。2例目はウガンダでの感染例で、45 mgの週1回投与を6週間続けた後に再発し(総量 5 mg/kg)、22.5 mg/日・3週間投与(総量 8 mg/kg)で治癒した。3例目はナイジェリアでの感染例で、標準療法での再発後、30 mg/日・3週間投与(総量 10 mg/kg)にて治癒に至った。

本研究では、プリマキンの増量で副作用が多くなるとする結果は得られなかった。プリマキンは以前には毒性の強い薬剤と考えられてきた。しかし、インドネシアでマラリア予防のために30 mg/日を服用し、43名は1年にわたり服用したが、副作用はプラセボ群より多くはなかった。また、ケニアでは9～14歳小児(平均体重 32 kg)をビタミン群、プリマキン 15 mg/日群(成人の高用量に相当)、メフロキン、ドキシサイクリン、クロロキン+プログアニル併用群の各小児相当量の5群にランダム化して、マラリア予防薬として11週間服用したが、プリマキン群での副作用が特別問題とはならなかった。このように、高用量での副作用の問題は特別大きいとは言えないとするデータが多いが、稀に問題となる可能性は否定できず、不必要な高用量投与を避けることは重要と思われる。今後、体重当たり総量をどのレベルにすべきかにつき、三日熱マラリアに対する効果の感染国別違いなどを含め、より多くのデータが集積されることが期待される。

E. 結論

三日熱マラリアにおけるプリマキンの再発予防効果については、体重当たり総投与量が重要と思われた。体重が重い症例では高用量が勧められるが、軽い症例では標準療法で効果が十分期待できる。また、体重当たりの投与量設定により、不必要な高用量による副作用の危険を避けることが可能となる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- [Kimura M](#), Koga M, Kikuchi T, Miura T, Maruyama H. Efficacy and safety of atovaquone-proguanil in treating imported malaria in Japan: The second report from the research group. *Parasitol Int* 2012;61:466-469
- 丸山治彦, 木村幹男. 我が国における寄生虫病・熱帯病薬物治療の実際. *日本臨床* 70;2205-2217, 2012

2. 学会発表

- ・大西健児, 木村幹男, 細川直登: わが国における赤痢アメーバ症, ジアルジア症に対するメトロニダゾール経口投与の現状. 第 86 回日本感染症学会総会・学術講演会. 長崎, 2012 年(4 月)
- ・Kikuchi, T., Shimizu, S., Koga, M., Miura, T., Maruyama, H., Kimura, M.: Efficacy and safety of atovaquone-proguanil in treating imported malaria in Japan: second report from the research group. 9th Asia Pacific Travel Health Conference (with 5th Regional Meeting of the International Society of Travel Medicine). Singapore, 2012 (May).

- ・ 木村幹男, 古賀道子, 菊地 正, 清水少一, 三浦聡之: 熱帯病治療薬研究班(略称)におけるパロモマイシンの使用経験. 第 61 回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第 59 回日本化学療法学会東日本支部総会 合同大会. 東京, 2012 年(10 月)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

国内における最適なマラリアの診断および治療体制の確立

研究分担者 春木 宏介

獨協医科大学越谷病院臨床検査部教授

研究要旨：新規に導入したイムノクロマトキット、BinaxNow Malaria によるマラリア診断は従来のキットと比べても非常に高い感度特異度を有し臨床における有用性が確認された。今後キットの体外診断薬としての認可が望まれる。またマラリア予防を目的に受診した旅行者の解析を初診日と出発日の間隔について調査したところ受診者の37.8%は出発直前の2週以内にはじめて受診していた。このことはマラリアの予防という観点から考えて啓発が必要と思われた。今までマラリアの診断、治療という観点から研究を進めてきたが今後はさらに予防という観点からも研究を行う必要性が考えられた。またドイツにおけるマラリアガイドラインの翻訳を行ったがドイツでは特に予防に重点を置いていることが判明した。

A. 研究目的

マラリアの診断において致死的结果を招く熱帯熱マラリアの治療は診断から始まる。また腸チブスやデング熱といった他の熱帯由来の輸入発熱性疾患との鑑別は海外帰国者の診療において重要となる。本研究は海外からの帰国者において他疾患とマラリアの鑑別におけるイムノクロマト法の有用性を検討することであるが、今回はアメリカのFDAで認可されているBinaxNow Malariaを新たに導入した。また予防は最善の治療であるという点から、予防に力を入れているドイツ熱帯医学国際保健協会・マラリア予防ガイドラインの翻訳ならびに渡航外来におけるマラリア予防薬の処方タイミングについても調査を行った。

B. 研究方法

イムノクロマト

研究班に参加し治療薬を保管している25施設に
従来配布していたマラリア診断キット entebe
Malaria (Laboratorium Hepatika社)Malaria Ag
P./Pan およびMalaria Ag (両者ともにStandard

Diagnostics社) から新たにBinaxNow Malaria(ア
ーリアメディカル社)に変更して配布、マラリア
を疑う熱性疾患患者に用いて鑑別診断を行った。
同時にギムザ染色も行った。ギムザ染色陰性でキ
ット陽性となった場合には、さらにギムザ染色を
継続しておこない虫体発見を試みた。

聖隷福祉事業団 聖隷横浜病院 総合診療内
科を受診したマラリア予防を目的に受診した旅
行者の解析を初診日と出発日の間隔について調
査した。

ドイツ熱帯医学国際保健協会・マラリア予防ガ
イドラインの翻訳を行った。

倫理面への配慮

本研究班では、厚生労働省「臨床研究に関する
倫理指針」(平成20年7月31日全部改正)を遵守
し、研究代表者の所属機関の倫理審査委員会に研
究計画書を提出し、平成22年7月28日付けで承
認を取得した。また当院での倫理委員会において
各機関でのイムノクロマト法使用について倫理
審査承認を取得した。また報告書に関しては匿名
性を保つため患者氏名は無記名とした。

C. 研究結果

報告症例数

今回の検査対象者の例数は51で国籍別内訳は表1のように日本人が最多であった(表1)。性別は男性が67%と多い傾向にあった(表2)。

国籍		度数	パーセント
有効	日本人	43	81.1
	アフリカ人	6	11.3
	その他	4	7.5
	合計	53	100.0

表1. 検査対象者内訳

性別		度数	パーセント
	男	36	67.9
	女	15	28.3
	不明	2	3.8
	合計	53	100.0

表2. 検査対象者性別

診断

マラリア原虫種の内訳では、熱帯熱が4例と最も多く、ついで三日熱が3例、四日熱1例であった。本年は卵形マラリアの報告はなかった(表3)。

原虫種		度数	パーセント
有効	熱帯熱	4	7.5
	三日熱	3	5.7
	四日熱	1	1.9
	合計	8	15.1

表3. マラリア原虫種の内訳

感度特異度

Binax Malaria キットの感度特異度および陽性、陰性的中率はともに100%と良好であった(表4)。

クロス集計表(疾患分類と検査キット結果)

疾患	検査キット結果		合計
	陰性	陽性	
その他の疾患	45	0	45
マラリア	0	8	8
合計	45	8	53

表4. 感度特異度および陽性、陰性的中率

53名の輸入感染症を疑われた発熱性疾患のうちマラリアは8例(15.1%)であった。マラリア以外では旅行者下痢症(Traveller's diarrhea:TD)およびデング熱がそれぞれ9例(17.0%)であった。ついで急性呼吸器感染(Acute respiratory infection:ARI)であった(表5)。

疾患分類

疾患分類		度数	パーセント
有効	malaria	8	15.1
	ARI	3	5.7
	TD	9	17.0
	dengue fever	9	17.0
	others	24	45.3
	合計	53	100.0

表5. 対象患者の最終診断による疾患分類

マラリア予防を目的に受診した旅行者の初診日と出発日の間隔について

メフロキンを処方する際は2-3週前に内服を開始し副作用を監視することが望ましい。マラリア予防目的で受診した37名の診療録より上記日数=DBJ(Days before the journey)を調査し、

様々な要因（アイテム）により影響を受けるか否か重回帰分析を行った。アイテムは性別、年齢、滞在期間、季節、渡航目的、マラリア流行度（低・高）、同時のワクチン接種の有無を選んだ。予測式を構築し（決定係数 $R^2=0.559$ ）標準偏回帰係数を比較したところ「ワクチン接種あり」というカテゴリーが DBJ を増加させ、「旅行者はマラリア感染に重要な季節、流行の度合について理解し早めに受診する」ということにはつながらないと推測された。旅行者の多くは旅行直前である 1-3 週間前に集中していた（図 1）。

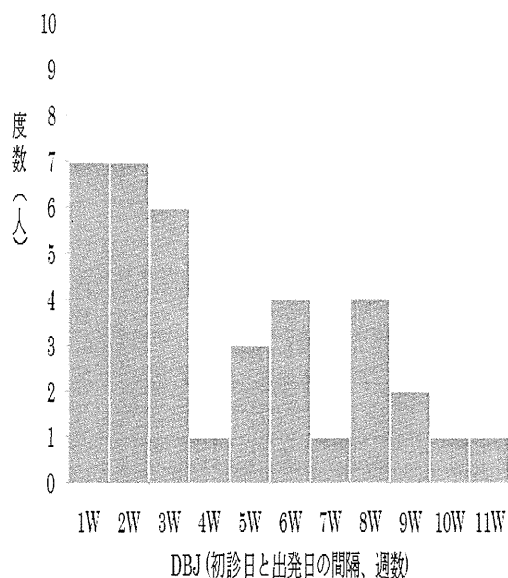


図 1. マラリア予防を目的に受診した旅行者の初診日と出発日の間隔

ドイツ熱帯医学国際保健協会・マラリア予防ガイドラインの翻訳

ドイツのマラリアガイドラインの翻訳を獨協医科大学越谷病院 臨床検査部の日谷明裕、党雅子、春木宏介ならびに姫路獨協大学 保健医療学部言語聴覚療法学科の濱村真理が行った。これは近いうちに日本渡航医学会から発行される予定である。内容的にドイツのガイドラインでは予防薬として我が国においても承認されたマラロンを

中心としたもので、長期にわたる予防内服にも言及している内容であった。

D. 考察

マラリアの診断方法としてはギムザ染色が必須であることは言うまでもない。しかしながら専門家ではない検査技師は熟練度が不足し診断に躊躇するケースが多い。特に種の鑑別は至難の業である。また少数寄生の場合の判断も困難である。抗原を検出するイムノクロマト法 (RDT: rapid diagnostic test) としてはマラリア原虫の pLDH (plasmodium lactate dehydrogenase) や HRP (Histidine Rich Protein), Aldolase 等を検出するものがあり簡易に行うことができることが特徴である。反応時間は 10 分であり外来でも可能である。これらのうち HRP を検出するものは感度が高く少数寄生でも検出することができる一方、治癒後も数か月の間陽性となる欠点がある。pLDH を検出するものでは少数寄生では感度は落ちるものの治癒により速やかに陰性化するため治癒判定に用いることができる。しかしながらギムザ染色は必須である。今回は新たにアメリカの FDA で認可されている BinaxNow Malaria を新たに導入し、検討を行ったが偽陰性、偽陽性は認められず、またプロゾーン現象も報告されなかった。BinaxNow Malaria は熱帯熱マラリアの HRP とその他のマラリアの Aldolase を検出するものである。現在マラリアの RDT はわが国ではいまだに体外診断薬としては認可されていない。研究用試薬であり保険請求もできないのが現状である。イムノクロマト法は簡便であるため、一般外来あるいは救急外来でのキットの導入は海外帰国者のマラリアの鑑別に有用であり、早期診断による治療あるいは専門機関への早期転送による重症化の予防に寄与する。早期の体外

診断薬としての認可が望まれる。

今回行った、マラリア予防を目的に受診した旅行者の初診日と出発日の間隔の調査からはマラリア予防薬に関するさらなる啓発が必要とされ last minute traveller に処方しやすい抗マラリア薬の認可が望まれた。DBJ という概念は、渡航前の準備の程度を数量的に評価する指標になり得ると考える。これは個々の旅行者、あるいは集団としての行動様式を定量できる可能性がある。

またドイツ熱帯医学国際保健協会・マラリア予防ガイドラインでは予防内服に関して詳しい記述と各地域における情報が掲載されており今後我が国のマラリアガイドラインに反映すべき点が多々見られた。

E. 結論

マラリアについて、本研究班では今まで治療が優先的に始まり、ついでそれにつながる診断法の一つであるイムノクロマト法について研究を進めてきた。今回新たにその前の段階である予防に関する基礎データを収集した。マラリアは予防可能な疾患でありその意味で海外の特に英語圏ではないドイツのガイドラインはわが国独自のマラリア予防に関しても大きな示唆を与えるものと思われた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ・日谷明裕、大槻和花、党雅子、春木宏介：帰国後診療機関を訪れた線虫症の一例. *Clinical parasitology* Vol.23 No.1 92-95, 2012

- ・大槻和花、日谷明裕、金田光正、党雅子、春木宏介：病院薬剤師として服薬指導を行ったアフリカ帰り卵形マラリアの一例. *Clinical parasitology* Vol.23 No.1 67-69, 2012

- ・日谷明裕、大槻和花、高谷周、党雅子、春木宏介：形態的な診断が困難であった卵形マラリアの1例. *臨床病理* Vol.61 No.1 32-37, 2013

3. 学会発表

- ・田里大輔、健山正男、宮城一也、原永修作、比嘉太、春木宏介、藤田次郎：Malaria Ag キットで治療経過を確認しえた三日熱マラリアの2例, 第60回日本化学療法学会学術集会, 長崎, 2012年4月26日-27日
- ・加藤康幸、新藤琢磨、山元佳、杉原淳、柳川泰昭、氏家無限、竹下望、高崎仁、金川修造、大曲貴夫、狩野繁之、春木宏介：マラリア原虫迅速抗原検出キットのわが国の渡航者を対象とした臨床性能試験. 第27回日本感染症学会学術集会, 長崎, 2012年4月25日-26日
- ・日谷明裕、大槻和花、党雅子、春木宏介：帰国後診療機関を訪れた線虫症の一例, 東京, 第23回日本臨床寄生虫学会大会. 東京, 2012年6月23日
- ・大槻和花、日谷明裕、党雅子、春木宏介：病院薬剤師として服薬指導を行ったアフリカ帰り卵形マラリアの一例. 第23回日本臨床寄生虫学会大会, 東京, 2012年6月23日
- ・日谷明裕、大槻和花、党雅子、春木宏介：デング熱罹患後に心身症と思われる症状が遷延化した一例, 第16回日本渡航医学会学術集会. 大阪, 2012年7月21日
- ・党雅子、日谷明裕、叶一乃、貫田宗男、春木宏介：旅行者下痢症の発症因子に関する研究. 第3回国際観光医療学会学術集会, 宇都宮, 2012年10月20~21日

・日谷明裕，党雅子，叶一乃，兵頭明夫，春木宏
介：メディカルツーリズムに伴う耐性菌輸入に
関する問題点．第3回国際観光医療学会学術集
会，宇都宮，2012年10月21日

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他

H.知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

なし

国内未承認薬の輸入・管理・供給

研究分担者 古賀 道子 東京大学医科学研究所 感染症分野助教

研究要旨 稀少疾病治療薬の中央保管機関として、薬剤の輸入から保管・供給までを一括して行った。2012年は薬剤使用症例の延べ数は107例であり、ここ3年間は供給数が増加し、未承認薬の薬剤供給を3-4日に1回施行していると考えられる。例年どおり、マラリア治療薬が半数以上をしめるが、中でもアーテメター・ルメファントリン合剤の使用数が増えてきている。本年度の特徴として、トキソプラズマ症治療薬のピリメタミンとスルファジアジンの需要が増えてきており、今後も同様の傾向がみられると推測された。

A. 研究目的

熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入から保管・供給までを一括して行い、国内未承認だが寄生虫感染症の治療に必要となる薬剤が、国内での感染症発生時に使用できる体制を整備しておく。国内発生例に対し使用することで、患者の救命・QOLの向上を目指す。また、これら国内未承認薬の需要を把握する。

B. 研究方法

熱帯病・寄生虫症治療に必要な薬剤で国内では入手できないものを研究分担者が個人輸入し、医科学研究所附属病院薬剤部の協力を得て、同部倉庫に適切に保管する。輸入薬剤の種類及び量は、前年度までの使用実績を考慮して決定する。輸入元は、過去の実績から手続きが滞りなく進む業者に依頼する。国内で薬剤を必要とする症例が発生した場合は、可及的速やかに薬剤を発送する。薬剤の使用は、あらかじめ定められた「使用機関」に限定し（表1参照）、その使用医師には「医師の責任の元で使用し、一切の責任を医師が負うこと。販売・譲渡はしないこと」を周知徹底する。薬剤の使用に関しては、各使用機関にて、倫理委員会の承認を得て、かつ患者様からも同意書を得て行う。

（倫理面への配慮）

輸入した国内未承認稀少疾病治療薬の患者への使用は、各薬剤使用機関の治験審査委員会において審査・承認を受け、使用に当たっては、患者へ、国内未承認薬であること、治療に必要な理由、起こりうる副作用等について説明し、同意を得たうえで使用し、使用に伴う一切の責任を担当医師が負う。

C. 研究結果

（1）今年度の薬剤使用実績と治療報告

薬剤の使用実績 2012年1月～12月
東京大学医科学研究所附属病院薬剤部で保管している全薬剤の2012年の使用実績を表2にまとめた。使用登録書の提出107例（のべ数）があった。過去3年間の供給数は94例、103例、107例と微増しており、約3-4日に1回、未承認薬剤を国内に供給した数に匹敵する。また、使用登録書の提出107例に対して、治療報告書の提出は72例で、報告率は67.2%であった。昨年の回収率（80.2%）より低下しており、今後も報告書提出の必要性について薬剤配布先の医師に理解協力を得る必要があると考えられた。

薬剤別に検討していくと、マラリア治療薬に関しては、のべ54回の薬剤投与があり、供給の50%

強を占めるのは例年通りであるが、再発予防に使用されるプリマキン(Primaquine)を除く内服(アーテメター・ルメファントリン合剤(Riamet)が11例、リン酸クロロキン(Avloclor)が7例)使用され、重症熱帯熱マラリアに対しては注射用キニーネが3例、アーテスネート座薬が10例に使用された。

昨年と同様、アーテメター・ルメファントリン合剤の使用が多かった(2010年は5例、2011年は13例、2012年は11例)。使用機関の医師達が好ましい薬剤として認識使用しているためと考えられた。

三日熱・卵形マラリアの根治療法として使用されるプリマキン(Primaquine)は23例に使用され、この6年間で最多であった。

次に使用数が多かったのは、例年通り、赤痢アメーバ症治療薬のパロモマイシン(Humatin)とメトロニダゾール(Metronidazole)注射液であった。パロモマイシンは使用量が多く、単価が高いため全薬剤のなかで最も多くの予算がかかっている。しかしながら、ここ数年、再発例に限っての使用をお願いしてきたため、本年は供与要請量が増えることなく、年間10症例までに落ち着いている。メトロニダゾール注射液は、引き続き偽膜性大腸炎にも使用されていた。

抗マラリア薬のアトバコン・プログアニル合剤と赤痢アメーバ症治療薬のパロモマイシンは平成25年春に発売となり、また、メトロニダゾール注射薬も近いうちの国内承認が見込まれている。本研究班の意義が確認された。

トキソプラズマ症に対するピリメタミン(Daraprim)、スルファジアジン(Sulfadiazine)の供給は増加しており、本年も14例に使用された。うち小児(先天性トキソプラズマ症等)が3例、妊婦1例であり、輸入熱帯病以外の稀少疾病治療薬を供給することができた。今後も継続すると思われる。

その他に目立ったものとして、ヒト肝蛭症(毎年0-1例であるが、本年は3例)に対しトリクラベンダゾール(Egaten)を供給し、稀な寄生虫感染症例に必要な薬剤を供与することができた。

(2) 重篤な有害事象報告について

本研究班の薬剤投与が原因の重篤な報告は一例

もなかった。

ピリメタミン、スルファジアジンによる骨髄抑制が1例(原疾患に対して免疫抑制剤を併用中)、また、同薬剤投与中原疾患による高カルシウム血症の進行が1例あった。リン酸クロロキンによる皮疹が1例、メトロニダゾール注射液使用中に原病の悪化で死亡が1例あった。

(3) 稀少疾病治療薬の確保

本年の輸入薬剤を表3にまとめた。個々の薬剤に関しては、保管中のものの量と使用期限、および過去の使用数から必要量を検討し、かつあらたに購入する全ての薬剤に関して、有効期限が長いロットを注文するように努めた。

輸入薬剤のうち、熱帯熱マラリアの治療に使われるアーテメター・ルメファントリン合剤(Riamet)および重症時に使用されるグルコン酸キニーネ(Quinimax)とアーテスネート(Plasmotrim)座薬に関しては、全国25か所にある薬剤使用機関に事前に送付した(アーテメター・ルメファントリン合剤とアーテスネート座薬は一症例分、グルコン酸キニーネは初期の1から2日分)。これらは、診断後直ちに使用されるべき薬剤であり、連絡を受けてから宅急便等で発送しては、人命を損なうこととなるため、人道上の判断から施行している。

しかし、グルコン酸キニーネの有効期限が本来短いうえ、輸入元に十分量が用意されておらず、供給が不安定となることが過去にあった。製造元から直接購入することに成功し、今後も依頼できることとなった。

D. 考察

本年も熱帯病治療薬の中央保管機関として、国内未承認の薬剤を海外から輸入し、国内での熱帯感染症発生時に全国の薬剤使用機関で使用してもらえるよう、東京大学医科学研究所附属病院の薬剤部の協力も借りて、保管・供給を行った。

国際的には、合併症のない熱帯熱マラリアの内服治療の第一選択は、アーテメター・ルメファントリン合剤(Riamet)に代表されるようなACT(artemisinin-based combination therapy)となっている。本邦承認薬のメファキン(メフロキン)に比べて、効力・副作用の両面で、アーテメター・ルメファントリン合剤は優れていると思われる。

海外渡航者が増加している我が国において、アーテメター・ルメファントリン合剤を含め、熱帯熱マラリアに使用されるグルコン酸キニーネやアーテスネートは、理想的には全国の使用機関に相当量を事前配布しておくのが望ましいと考えているが、現状の輸入体制や、各機関での管理体制が未承認薬を扱うには万全にはほど遠い状況であることから、引き続き中央管理体制が望ましいと考えられた。

パロモマイシンとメトロニダゾール注射薬は、輸入薬剤の中でもコスト的に大きな割合を占めているが、前述のようにパロモマイシンは平成25年春に販売され、メトロニダゾールは承認される見込みである。赤痢アメーバ症のみならず偽膜性腸炎などでの需要が高いことから、患者・医師の双方にとって好ましい形になることが期待できる。この他にも、アトバコン・プログアニル合剤が国内発売となり、本研究班での使用実績がこれらの承認に向け役立っていると考えられ、大きな成果といえるであろう。

E. 結論

本年も熱帯病・寄生虫症治療薬の輸入・保管・供給の中央機関としての体制の整備・充実をはかった。本年度の特徴として、合併症のない熱帯熱マラリアに対し、アーテメター・ルメファントリン合剤を使用する回数が増加している。海外渡航者の増加に伴い、我が薬剤使用機関の医師達も、

世界的標準治療に準じて薬剤選択をしている事が伺われ、今後もこの傾向は続くと考えられた。

赤痢アメーバ症治療薬のパロモマイシンやメトロニダゾール注射薬の需要は例年通り高く、またトキソプラズマ症治療薬のピリメタミンとスルファジアジンの需要も依然として高い事が分かり今後も、当面同様の傾向がみられると推測された。

F. 研究発表

1. 論文発表

・ Kimura M, Koga M, Kikuchi T, Miura T, Maruyama H. Efficacy and safety of atovaquone-proguanil in treating imported malaria in Japan: the second report from the research group. Parasitol Int. 2012 Sep;61(3):466-9.

2. 学会発表

・ Tadashi Kikuchi, Shoichi Shimizu, Michiko Koga, Toshiyuki Miura, Haruhiko Maruyama, Mikio Kimura. Efficacy and safety of atovaquone-proguanil in treating imported malaria in Japan: second report from the research group. ISTM, 2012

G. 知的所有権の出願・取得状況

該当なし

表1. 平成22年度の薬剤使用責任者・使用機関

使用責任者	使用機関
足立 憲昭	市立釧路総合病院小児科
永坂 敦	市立札幌病院感染症科
神田 暁郎	仙台市立病院内科(感染症科兼務)
春木 宏介	獨協医科大学越谷病院臨床検査部
野口 博史	成田赤十字病院 感染症科/第3小児科
古賀 道子	東京大学医科学研究所 先端医療研究センター 感染症分野
加藤 康幸	国立国際医療センター戸山病院国際疾病センター
大西 健児	都立墨東病院感染症科
菅沼 明彦	都立駒込病院感染症科
木村 幹男	結核予防会新山手病院内科
古川 恵一	聖路加国際病院内科感染症科
立川 夏夫	横浜市立市民病院感染症部
塚田 弘樹	新潟市民病院感染症科/呼吸器科
長谷川 千尋	名古屋市立東部医療センター感染症科
三笠 桂一	奈良県立医科大学附属病院感染症センター
清水 恒広	京都市立病院 感染症科
後藤 哲志	大阪市立総合医療センター 感染症センター
玉置 俊治	りんくう総合医療センター 内科
岩田 健太郎	神戸大学大学院 医学研究科 微生物感染症学講座 感染治療学分野
福本 宗嗣	鳥取大学医学部感染制御学講座医動物学分野
高田 清式	愛媛大学医学部附属病院 総合臨床研修センター/感染症内科
青木 知信	福岡市立こども病院・感染症センター
森本 浩之輔	長崎大学熱帯医学研究所 臨床医学分野
丸山 治彦	宮崎大学医学部 感染症学講座 寄生虫病学分野
健山 正男	琉球大学大学院医学研究科感染病態制御学講座 分子病態感染症学分野

表 2. 2012 年 1 月～12 月の研究班薬の使用状況

使用薬剤(一般名)	使用薬剤(商品名)	疾患名	症例数	治療報告書数
メトロニダゾール	Metronidazole	偽膜性腸炎	3	2
		赤痢アメーバ症	5	4
		その他	3	2
アーテメター・ルメファン トリン合剤	Riamet	熱帯熱マラリア	9	8
		三日熱マラリア	2	2
プリマキン	Primaquine	ニューモシスチス肺炎	2	2
		三日熱マラリア	19	14
		卵形マラリア	4	3
アーテスネート	Plasmotrim	熱帯熱マラリア	9	5
		三日熱マラリア	1	1
ピリメタミン	Daraprim	トキソプラズマ症	14	9
スルファジアジン	Sulfadiazine	トキソプラズマ症	13	8
パロモマイシン	Humatin	赤痢アメーバ症	10	6
リン酸クロロキン	Avloclor	三日熱マラリア	6	4
		卵形マラリア	1	0
グルコン酸キニーネ	Quinimax	熱帯熱マラリア	3	1
トリクラベンダゾール	Egaten	肝蛭	3	1
	合計		107	72

表 3. 今年度(2012年4月～2013年3月)の薬剤輸入内訳

一般名	商品名	規格	単位あたり量	輸入量
リン酸クロロキン	AVLOCLOR	1錠=0.25g	1本	4箱
スチボグルコン酸ナトリウム	Pentostam	100ml	1本	2箱
グルコン酸キニーネ	Quinimax	注射液、250mg/2ml/ampule	3ampule	30箱
グルコン酸キニーネ	Quinimax	注射液、500mg/4ml/ampule	3ampule	80箱
イセチオン酸プロパミジン	Brolene	点眼液、0.1%/10ml/本	1本	5箱
アーテメター・ルメファントリン 合剤	Riamet	20/120mg、錠剤	24錠	44箱
ニタゾキサニド	Alinia	500mg、錠剤	60錠	2箱
プリマキン	Primaquine	7.5mg、錠剤	100錠	30ボトル
スルファジアジン	Sulfadiazine	500mg、錠剤	56錠	20箱
エフロールニチン	ORNIDYL	注射液、20g/100ml/vial	1本	12箱

新規住血吸虫症治療薬の薬効評価に関する比較研究

研究分担者 太田 伸生 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・教授

研究要旨

抗マalaria薬として研究が進んできた N-89 には強力な抗住血吸虫作用も観察されるため、その臨床応用を目指して薬効機序についての解析を進めた。マalaria原虫と住血吸虫はヘモグロビンを分解して栄養とする点で生物学的な共通点があり、そのヘム代謝に与える影響がその薬効機序解析の鍵になるとの仮説の元で実験を進めた。マンソン住血吸虫のヘム代謝に及ぼす N-89 の作用を *in vivo* 及び *in vitro* で解析するとともに、作用させた N-89 が具体的に住血吸虫のどの部位に蓄積するのかの解析を試みた。さらに N-89 を作用させたことによる影響を発現タンパク質の動態として評価するためにプロテオーム解析にも着手した。その結果、N-89 は住血吸虫のヘム代謝酵素系よりもむしろ赤血球摂取自体を阻害していると考えられる事、作用させた N-89 はマンソン住血吸虫幼虫の体表から効率よく取り込まれて細胞質に蓄積する事、ただし、細胞内の局在までは解析が進まなかった事、および雌虫のタンパク質 folding やエネルギー産生系に影響するタンパク質発現に影響する事などが確認できた。N-89 は artemisinin 系薬剤と同様に住血吸虫に対しても高い選択毒性を示すものの、その両者の作用機序は必ずしも同一ではない可能性が考えられ、今後の住血吸虫病治療戦略の中で、それぞれに適した使用法に向けた検討の必要性が確認された。

A. 研究目的

住血吸虫症は熱帯地方を中心に 2 億人を超す患者数と年間 25 万人の死亡原因となる重要な感染症である。特効薬・プラジカンテルの出現以降は急速に死亡者数を減らした事情もあり、今日では健康被害が大きいにもかかわらず、疾病対策の重要性が認識されない典型的な Neglected Tropical Diseases である。

合成過酸化化合物 N-89 は新規抗マalaria薬として開発研究が進んでいるが、その生物活性として artemisinin 系薬剤のそれと類似している可能性が示されている。Artemisinin 系薬剤はマalariaのみでなく、住血吸虫にも強い活性を持つ事から N-89 にも同様の効果を期待した事が本分担研究の契機であった。実際に *in vivo* 実験では、マンソン住血吸虫の幼虫を強く障害することが確認されたが、さらに興味深い現象は N-89 を宿主に投与すると宿主体内の雌成虫が産卵しなくなることであった。この現象は artemisinin 系薬剤を含む他の抗住血吸虫薬では観察されていない効果であり、今後の N-89 の有用性に関する議論のポイントになる。

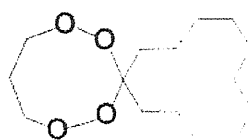
本分担課題では、住血吸虫症の新規治療薬と考えられる合成化合物 N-89 がマンソン住血吸虫の雌成虫に作用した場合に、虫体にどのように取り込まれて、それが住血吸虫のどの分子に

作用して効果を示すのかを明らかにする目的で、主として *in vivo* での解析を進めた。この事を通じて、新規の抗住血吸虫治療薬の薬効標的を明らかにし、それを元に新たな治療薬開発につながる情報の取得を目指したものである。

B. 研究方法

(1) マンソン住血吸虫 (Sm)(Puerto Rico 株)を用いた *in vivo* の経口投与による抗住血吸虫作用のうち、感染 5 週で投与することによる雌成虫の生殖阻害効果を解析した。

N-89 は図 1 に示したように構造的にはきわめて簡略な分子である。Artemisinin と同様に endoperoxide 構造を持ち、これが抗マalaria原虫活性のキーであるとされる。



(図 1 N-89 の構造式)

(2) N-89 の *in vivo* 効果の検討として、BALB/c マウスに Sm セルカリア 180 匹を経皮感染させて感染 5 週後に N-89 を 300mg/kg、2 日連用でオリーブオイルと共に経口投与を行い、感染 8 週でマウスを解剖して虫体を回収し

て、虫体のカテプシンアッセイを行うとともに、回収した成虫を *in vitro* で培養し、そこに蛍光ビーズを添加して、その摂取の定量評価を特異的な蛍光強度の測定によって行った。

(3) 感染 5 週後に N-89 投与を行った後、宿主マウスから成虫を回収し、虫体の破碎後にタンパク質を得て 2 次元電気泳動パターンを調べるとともに、トリプシン処理を行った標品を LC-MS-MS 解析に供した。

(4) N-89 の住血吸虫への取り込みを観察するために、*in vitro* で機械的に処理してシストソミューラを得て、それに N-89 と構造が類似する N-251 を蛍光標識したものを添加し、虫体への取り込みを蛍光顕微鏡にて観察した。

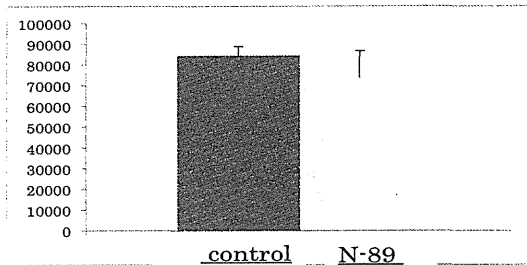
[倫理面への配慮]

本研究は東京医科歯科大学の実験動物委員会による承認を得たうえで実施した。

C. 研究成果

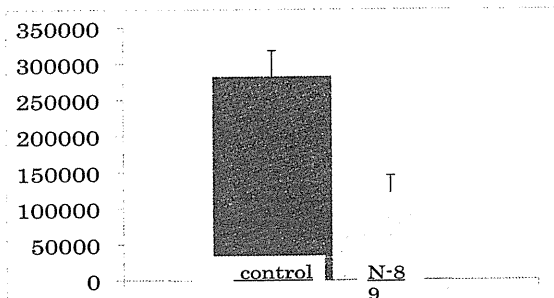
(1) Sm セルカリア感染後 5 週で N-89 を経口投与することによる寄生虫体内のヘム含量低下の機序として、ヘモグロビン代謝酵素の阻害による可能性と住血吸虫の経口的摂取障害の 2 つの可能性を検討した (図 2)。

図 2 N-89 投与によるカテプシン B 活性への影響



一方、寄生虫が外部の物質の取り込みが阻害されている可能性として、虫体培養系に蛍光ビーズを投与して、蛍光強度を単位体重あたりの補正值で求めた所、N-89 投与により、ビーズの取り込みが対照に比べて有意に低下していた (図 3)。

図 3 N-89 投与による虫のビーズ摂取阻害効果



(2) プロテオームによる N-89 のマンスン住血吸虫成虫の発現タンパク質に与える影響解析として、以下の事項がわかった。

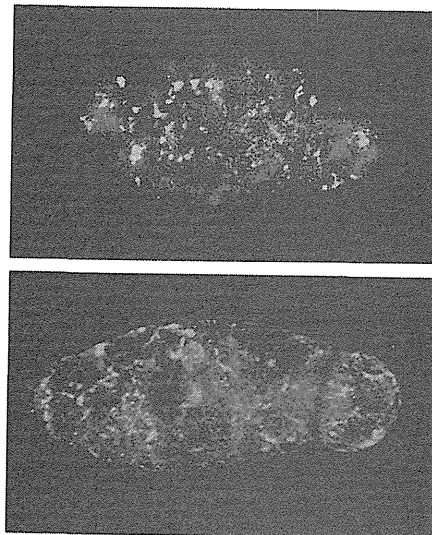
(a) 雄虫特異的な変化：レドックス関連タンパク質 (Thioredoxin, Thioredoxin peroxidase, Glutathion S-transferase) など

(b) 雌虫特異的な変化：Protein folding に関するもの (Protein disulfide isomerase, Endoplasmin) など

及び：ATP synthesis/ hydrolysis 関連タンパク質 (Similar to F1-ATPase β -subunit, 26S proteasome subunit ATPase 2) など

(3) N-89 関連化合物の住血吸虫幼虫への取り込みについて調べた。N-89 自体は構造がシンプルに過ぎて標識が困難であるため、関連化合物である N-251 を用いて PE 蛍光標識し、*in vitro* で 120 分間処理した後の蛍光シグナルを観察した。その結果、N-251 は幼虫体の表面から吸収されて細胞質に蓄積する事が確認された (図 4)。しかし、マラリア原虫の場合に確認されたような小胞体への蓄積か否かは確認できなかった。

図 4 N-89 投与前 (上段) と投与後 (下段) の PE 標識 N-251 シグナルの比較



D. 考察

住血吸虫症治療薬としてプラジカンテルが高い効果と安全性を示すことから過去 30 年以上に亘って唯一の選択薬剤として用いられてきた。しかし、プラジカンテル耐性株の出現が疑われる事態になり、今日では代替薬または補完薬の確保は急務である。

合成化合物 N-89 はマラリア原虫と住血吸虫双方に効果の高い薬剤候補物質であるが、その

機序の解明は進んでいない。N-89 がマラリア原虫と住血吸虫双方に効果を持ちうることは、二つの寄生虫が共有する宿主ヘモグロビンの利用機序に阻害効果を持つ可能性を示唆するが、直接的な証明には至っていない。

今年度の検討で明らかになった事は、感染 5 週後の投与、すなわち雌虫に対して強力な産卵抑制効果を持つ現象の背景には、少なくともカテプシン B や D などの酵素系には影響が確認できず、一方で赤血球などを経口的に取り込む機能が阻害されている事である。すなわち、N-89 の投与によって住血吸虫は栄養吸収が阻害されて飢餓状態に陥っている事が考えられた。

その機序を説明する事が次のステップとなるが、現状で取りうるアプローチは限られている。プロテオームによる網羅的な解析から何か情報が得られないかと解析したが、N-89 の雌虫に対する作用としてエネルギー産生系に影響がある可能性が示唆された。住血吸虫の場合は RNAi 以外には遺伝子発現調節が困難であるが、取りうる方法により、薬効標的分子の同定を試みる必要がある。

N-89 関連物質は比較的効率よく住血吸虫に取り込まれる事がわかった。体表から吸収されて細胞質に蓄積するが、細胞内の局在場所の確定までは解析が進まなかった。今後は細胞内小器官を検出する抗体とともに解析を進めるが、N-89 はマラリア原虫の小胞体に蓄積すると報告されているので、当面はマラリア原虫の場合との異同を検討して行く。

今回検討した N-89 以外にも抗マラリア剤が住血吸虫症の治療効果を持つことが明らかになっている状況で、マラリア治療薬の使用が住血吸虫症の疫学状況に影響するののかという疑問が起こってくる。マラリアと住血吸虫症の流行域が重複する多くの熱帯地方では、このよう

な視点から疫学解析を行う事は重要であり、それぞれの疾患の治療ガイドンス確定のためにも N-89 の作用機序に関する基礎情報整備が望まれる。

E. 結論

住血吸虫症に対する新規薬剤候補として N-89 は雌成虫のヘモグロビン利用を阻害しているが、その機序として、少なくとも赤血球の経口摂取が阻害されている事が確認された。N-89 系薬剤は住血吸虫の体表から吸収され、細胞質に蓄積されるが、その結果としての代謝系やエネルギー産生系への影響を明らかにする必要がある。これらを踏まえて、N-89 の実際の応用法について検討が進められなければならない。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) El-Malky MA, Lu SH, El-Beshbishi SN, Saundy NS, Ohta N. Effect of Mirazid in *Schistosoma japonicum*-infected mice: parasitological and pathological assessment. *Parasitol Res.* 112:373-7, 2013.

(2) Okumura-Noji K, Miura Y, Lu R, Asai K, Ohta N, Brindley PJ, Yokoyama S. CD-36-related protein in *Schistosoma japonicum*: candidate mediator of selective cholesteryl ester uptake from high-density lipoprotein for egg maturation. *FASEB J*, 27:1236-44, 2013.

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

米国特許出願中 33432 (2012)

厚生労働科学研究費補助金

(創薬基盤推進 研究事業) 分担研究報告書

国内未承認薬の品質確保に関する研究

分担研究者 坂本 知昭 国立医薬品食品衛生研究所 薬品部主任研究官

研究要旨 リアメット錠はアーテメーターとルメファントリンの合剤であるが、UV吸収をもつルメファントリンの含量が高く、一方でUV吸収をもたないアーテメーターの含量が低いため、同時定量は困難であった。そこで、不揮発性物質であれば検出することが可能な蒸発光散乱検出器 (Evaporative light scattering detector; ELSD) を用いて2種類の有効成分の同時定量が可能な分析条件の検討を行った。また、代謝物であるジヒドロアーテミシニン、類縁化合物であるアーテミシニン及びアーテスネートを含めた5種類の化合物の一斉分析法の開発も試みた。ELSD検出器の温度 (移動相の揮発化温度) を30℃, カラム温度を40℃に設定し、移動相として0.2 M TFA水溶液を用いることにより、ハイスループットカラムの適用で約20分の分析時間で5種類の化合物の分離に成功した。また、リアメット錠の抽出液からELSDにおける感度比が大きく異なるアーテメーターとルメファントリンを同時に定量するため、揮発性の高いアーテメーターにイオン対を形成することにより、ネブライザー内での揮発を抑制し、感度比の差を小さくすることで、濃度比一定のまま両者の同時分析を行うことを試みた。本研究の成果によって、リアメット錠の2種類の有効成分のほか、セスキテルペン・ラクトン過酸化物に属する一連の抗マラリア薬の簡易検定が可能となった。

A. 研究目的

日本では未承認である稀少疾病用の医薬品について、それらの適用対象疾患に冒され、重篤な状態にある患者に対して安全に適用するために、研究班で輸入する未承認医薬品の“有効性及び安全性”を確保することを目的に本研究を行う。

海外ではすでに使用されているが、日本で未承認の医薬品である稀少疾病用治療薬の有効性と安全性を確保するためには、それらの医薬品の品質について検討し、一定の品質の医薬品を供給することが必要である。そこで、本研究班が輸入し、稀少疾病用治療薬として供給する医薬品の品質評価を行うとともに、適切で一定の品質をもつ医薬品を供給することを目的とする。

今年度は、リアメット錠の有効成分であるアーテメーター及びルメファントリンを含むセスキテルペン・ラクトン類の一斉分析条件の開発を行った。セスキテルペン・ラクトン系抗マラリア薬としてはアーテミシニンおよびその誘導体であるアーテメーター、アーテスネート、ジヒドロアーテミシニンなどが使用されてい

る。これらはUV吸収を持たない化合物であり、電気化学検出器 (ECD)、質量分析等が中心として適用されている。本研究ではアーテメーター及びルメファントリンの同時分析を中心に、セスキテルペン・ラクトン類を誘導体化することなく HPLC 分析が可能な蒸発光散乱検出器 (ELSD) を用いた分析法を開発した。

B. 研究方法

B-1. 標準溶液を用いた各化合物の分離条件の最適化

アーテメーター、アーテミシニン、アーテスネート、ジヒドロアーテミシニン及びルメファントリンの各化合物は市販試薬 (純度98.0%以上) を購入し、標準物質として用いた (図1)。

クロマトグラフィーカラムは、親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) カラムと逆相系カラムとしてODSカラムを選定した。HILICカラムは、BEH HILIC (50 mm x 1.0 mm I.D., 粒径1.7 μm, Waters)、Atlantis HILIC (50 mm x 4.6 mm I.D., 粒径3 μm, Waters)を用いた。移動相は、アセトニトリルと0.2M TFAの混液 (50:50 v/v%) 又は同混液 (70:30 v/v%)、流速は前者において0.2 ml/min、後者において0.8 ml/min)

に設定した。

ODS カラムは、CADENZA CW-C₁₈ (250 mm x 3 mm I.D., 粒径3 µm, Imtakt), CADENZA CL-C₁₈ (250 mm x 3 mm I.D., 粒径3 µm, Imtakt), Symmetry C₁₈ (150 mm x 4.6 mm I.D., 粒径5 µm, Waters) 及びKINETEX (50 mm x 2.1 mm I.D., 粒径1.7 µm, Shimadzu GLC) を用いた。移動相はメタノールと0.2M TFAの混液 (70:30 v/v%) 又はアセトニトリルと0.2M TFAの混液 (80:20 v/v%) のアイソクラティック条件、又はアセトニトリルと0.2M TFAのグラジエント条件 (42 v/v% → 45 v/v%(3min) → 95 v/v% (3.5min) → 95 v/v% (25min) → 42 v/v% (25.5min) → 42 v/v% (30 min)の何れかに設定した。

高速液体クロマトグラフィーシステムは、ELSD 検出器 (ELSD-LT II, 島津製作所) を接続した島津 Class VP-10 HPLC systemを用いた。検出条件は圧力及びネブライザー温度をそれぞれ350 kPa及び30°C に設定した。また、注入量は5 µlに設定した。

分析条件の最適化に関する検討を行うため、各カラムの分離検討用サンプルとして、アーテメーター3 mg/ml、またアーテミシニン、アーテスネート、ジヒドロアーテミシニン、ルメファントリン各1 mg/mlの濃度のメタノール溶液を調製した。これらの標準溶液を用いて、ELSDの設定温度の最適化ならびにカラム温度の最適化に関する検討を行った。

B-2. リアメット錠からのアーテメーター及びルメファントリンの同時分析条件の検討

リアメット錠に含まれるアーテメーター及びルメファントリンの量は表示量としてそれぞれ20 mg及び120 mgである。ルメファントリンの含量はアーテメーターの6倍であり、かつELSDにおけるアーテメーターの感度は非常に低く、一方、ルメファントリンの感度は高い。そのため、この混合比のサンプル溶液ではルメファントリンのシグナルはスケールアウトした。従ってB-1.で検討した分析条件では、製剤からの抽出溶液の同時分析は困難であることが予想された。そこで、イオン対試薬を加えてアーテメーターのイオン対を形成することで揮発を抑制し、ELSDでの検出感度を増大させることを試みた。カラムはKINETEX (50 mm x 2.1 mm I.D., 粒径1.7 µm, Shimadzu GLC) を用いた。

イオン対試薬としてアルキル側鎖の長いPentadecafluorooctanoic acid (PFFA-8)を選定した。イオン対試薬の添加濃度を2.5 mMと5.0 mMの2種類を設定し、表示量と同様の比率の

両化合物の混合標準溶液 (アーテメーター 0.2 mg/ml、ルメファントリン 1.2 mg/ml) を用いて、両化合物が適切な検出濃度範囲に含まれる条件が得られるかどうか検討した。

また分析法のバリデーションを実施し、設定した分析条件が適切な分析能を有していることを評価した。

(倫理面への配慮)

動物を用いた研究を行っておらず、配慮すべき事項は特になし。

C. 研究結果

C-1. 標準溶液を用いた各化合物の分離条件の最適化

C-1-1. ELSDの温度設定

ELSDの温度を30°C、35°C、40°C、50°C及び60°Cに設定した際のアーテメーター、アーテミシニン、アーテスネート及びジヒドロアーテミシニンのピーク強度の変化を図2に、また30°Cにおけるピーク強度を1とした場合の、各温度における相対ピーク強度を表1に示した。アーテスネート (60°C以外) を除く化合物において濃度依存的にピーク強度が減少した。特にアーテメーターは35°Cにおいて30°Cの約60%、40°Cにおいて約10%、さらに60°Cでは約1%までピーク強度が減少した。また、アーテメーターの分解物として錠剤中より検出される可能性があるジヒドロアーテミシニンは35°Cで約80%、60°Cでは約10%までピーク強度が減少した。また、この化合物の場合には40°C以上でα-体とβ-体の分離がみられるようになった。これらの結果から、検討したELSDのネブライザー温度については30°Cが適切であるものと考えられた。

C-1-2. カラム温度の影響

ELSDの検出器の温度を30°Cに設定し、アーテメーターの定量性に対するカラム温度の影響を確認した。カラム温度を60°C、50°Cおよび40°Cに設定した際の定量性の変化を図3及び表2に示した。いずれのカラム温度でも良好な直線性を示し、定量性に影響がないことが確認された。

C-1-3. ジヒドロアーテミシニンの測定条件

ジヒドロアルテミシニンはメタノールあるいはアセトニトリル/水系の移動相ではα-体とβ-体が分離され、その割合は時間とともに変化し、図4及び表3に示すようにサンプリン

グ初期はβ-体が主で、60分後には逆転し、α-体が増加していく傾向がみられた。また、図5に示すようにα-体とβ-体の分離はカラム温度に影響を受けた。カラム温度が40℃から50℃、60℃と高くなるに従い分離の程度を示す分離度の値は1.14, 1.11, 1.09と小さくなり、分離は悪くなった。

そこで、精度の高い定量を達成するために、α-体とβ-体を分離せずに一つのピークとして検出する移動相条件を検討した。その結果、TFA（トリフルオロ酢酸）水溶液を希釈溶媒とすることでピークの変換を防ぐことが可能であることがわかった。図6に示すように、TFAの濃度が高くなるに従いα-体とβ-体のピークが近づき、0.2 MのTFA水溶液を用いることにより一つのピークとして検出することが可能となった。以上の結果からジヒドロアルテミシニンの測定条件としては、カラム温度を40℃に設定し、移動相としては0.2 MのTFA水溶液を用いることとした。

C-1-4. 分離カラムの選定

2種類のHILICカラム（BEH HILIC, Atlantis HILIC）及び4種類のODSカラム（CADENZA CW-C₁₈, CADENZA CL-C₁₈, Symmetry C₁₈, KINETEX）を用いて得られたクロマトグラムを図7～図12に示した。

HILICカラムの場合は2種類のいずれのカラムも（図7、8）ルメファントリン以外のアーテメーター、アーテミシニン、アーテスネート及びジヒドロアーテミシニンは全て分離されず一つのピークとして検出された。

ODSカラムのCADENZA CW-C₁₈（図9）ではアーテスネートとジヒドロアルテミシニンが、CADENZA CL-C₁₈（図10）ではアーテミシニンとジヒドロアルテミシニンが、Symmetry C₁₈（図11）ではアーテスネートとジヒドロアルテミシニンが、それぞれほぼ同時に検出された。KINETEX（図12）では5種類の化合物が良好に分離された。

C-2-1. 試料溶液調製のための溶媒の検討

リアメット錠剤の成分であるルメファントリンは骨格として3級アミンを持ち、そのlog P値は8.81と報告されており、非常に脂溶性の高い化合物である。そこで試料溶液を調製する際の希釈用液にエタノールと0.5%ギ酸（FA）/メタノール溶液を選定した。

表4に示すようにHPLCで得られた2種類のサンプルの面積値はほぼ同じ結果であったが、メタノール溶液の場合には2日後には結晶

の析出が見られ、高濃度のサンプル調製には不向きであった。

C-2-2. イオン対試薬を含む移動相の調製

図13に示すようにイオン対試薬PFFA-8を用いることにより、アーテメーターの検出感度が改善され、一方、ルメファントリンの溶出時間が遅くなることにより、スケールアウトすることなく測定でき、両成分の同時分析が可能となった。

C-2-3. アーテメーター及びルメファントリンの分析法バリデーション

図14に示すようにこの条件下でのアーテメーター及びルメファントリンの定量性は良好で相関係数 r^2 はそれぞれ0.9997及び0.9994であった。表5に示すようにアーテメーターの検出限界及び定量限界はそれぞれ、120 mg/ml溶液で1.03 µg/ml及び1.13 µg/ml、60 mg/ml溶液で1.09 µg/ml及び1.34 µg/ml、ルメファントリンに関しては400 mg/ml溶液で1.03 µg/ml及び1.10 µg/ml、120 mg/ml、溶液で1.02 µg/ml及び1.17 µg/mlであった。

C-2-4. リアメット錠中のアーテメーター及びルメファントリンの定量

表示量としてアーテメーター20 mg及びルメファントリン120 mgを含むリアメット錠剤中のアーテメーター及びルメファントリンの含量は表6に示すように100.21 ± 0.11%及び100.08 ± 0.01%であった。また、それぞれの添加回収率は99.7%～108.8%及び101.8%～112.6%であった。

D. 考察

本研究では、アーテメーター及びルメファントリンの同時分析を中心に、その構造類似体であるアーテスネート、アーテミシニン、ジヒドロアルテミシニンの一斉分析をHPLC-ELSD法により達成することが可能であった。

アーテメーターの検出感度は他の化合物に比較してELSD検出器の設定温度により影響を受け易く、温度が高いほど感度は低下する傾向が見られたことから、高い温度の設定が困難であった。本研究ではELSDネブライザー温度を30℃に設定した。また、ジヒドロアルテミシニンはα体とβ体が存在し、混合比が時間とともに変化し、またカラム温度が高いほどα体とβ体の分離が悪くなる傾向が認められた。定量性を考慮してα体とβ体を分離せずに検出する条件を検討し、0.2MのTFA水溶液を移動相と